Über die Teilungsfähigkeit von E. coli bei geringem Nährstoffangebot und niedriger Temperatur

von

Manoutchehr Watanpour

aus Babol/Iran

1967

1967 # 301

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535725_0077

Aus dem Hygienischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. M. Knorr

Über die Teilungsfähigkeit von E. coli bei geringem Nährstoffangebot und niedriger Temperatur

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Manoutchehr Watanpour
aus Babol/Iran

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. E. Wetterer

Referent: Prof. Dr. M. Knorr

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Okt. 1967

An dieser Stelle erlaube ich mir,
meinen besten Dank auszusprechen

Herrn Prof. Dr. med. M. Knorr
für das Überlassen des Themas
und die freundliche Unterstützung
bei der Ausführung dieser Arbeit,

und Herrn Doz. Dr. med. F. Selenka
für die vielen wertvollen Anregungen
und die großzügige Förderung der Arbeit.

I n h a l t

A) Einleitung 1

B) Bisherige Beobachtungen über das Verhalten von E. coli in Wasser 4

C) Eigene Untersuchungen 11

1) Vorbereitung des Keimmaterials 11

2) Versuchsanordnungen zur Feststellung der Zellteilung 12

a) Anwendung der Membranfiltermethode 12

b) Auszählung in Zählkammern nach Anreicherung durch Zentrifugation 15

c) Langfristige Direktbeobachtung in Zählkammern 17

D) Ergebnisse der Direktbeobachtung 21

1) Versuche mit Aqua dest. als Suspensionsmedium 21

2) Versuche mit Brunnenwasser als Suspensionsmedium 21

3) Versuche mit Bouillon als Suspensionsmedium 21

4) Förderung der Zellteilung durch Nährstoffe bei niedrigen Temperaturen 3o

E) Diskussion 4o

F) Zusammenfassung 47

G) Literaturverzeichnis 5o

Über die Teilungsfähigkeit von E. coli bei geringem Nährstoffangebot und niedriger Temperatur.

A) Einleitung

Die Anwesenheit von E. coli in Lebensmitteln gilt als Zeichen für eine Verunreinigung mit Fäkalspuren. Bei Überschreitung festgelegter Grenzzahlen werden auf Grund bestehender Verordnungen polizeiliche Maßnahmen gegen denjenigen ergriffen, der das Nahrungsmittel in den Verkehr brachte.

Ganz besonders gilt dies für unser Hauptnahrungsmittel Trinkwasser. Trinkwasser soll in 100 ml kein E. coli (Fäkaltyp) enthalten. Wenn dies trotzdem der Fall ist, wird eine Beanstandung ausgesprochen und das Wasser als ungeeignet für menschliche Trink- und Brauchzwecke bezeichnet.

Eine solche Beanstandung hat in der Regel zwar keine strafrechtlichen, wohl aber wirtschaftliche Folgen. Schon die Auflage, das für menschliche Genußzwecke vorgesehene Wasser abzukochen oder chemisch zu behandeln, führt zu spürbaren finanziellen Belastungen. Erst recht verteuernd wirken sich Brunnenneuanlagen oder Anschlüsse an bestehende zentrale Wasserversorgungsanlagen aus.

Beanstandungen sollten daher nur nach Berücksichtigung verschiedener Fehlermöglichkeiten, die durch die bei der Probenentnahme im Brunnen herrschenden Bedingungen hervorgerufen werden oder die beim Vorgang der Entnahme selbst, beim Transport und der Untersuchung der wasserproben auftreten können, ausgesprochen werden.

Eine Fehlerquelle bei der hygienischen Beurteilung von Brunnen und Wasserversorgungsanlagen stellen Keimvermehrungen dar, die möglicherweise bei stagnierendem Wasser im Brunnen selbst oder während des Transports der Wasserproben vom Entnahmeort zum Labor stattfinden.

So kann z.B. ein regelmäßig betriebener Brunnen über lange Zeit hin ein hygienisch tragbares Wasser liefern, d.h. ein solches, bei dem höchstens in Litermengen gelegentlich Coliforme und E. coli gefunden werden können. Wird aber der Brunnen längere Zeit außer Betrieb gesetzt, so sind in dem stagnierendem wasser je nach seinem Nährstoffgehalt und seiner Temperatur Keim- und Colizahlanstiege möglich. Diese Überlegung entspricht den tatsächlichen Beobachtungen, wie sie an längere Zeit nicht betriebenen Brunnen von geringer Tiefe häufig angetroffen werden.

Die gleichen Vorgänge können sich auch nach der Entnahme abspielen, wenn die Probe ungekühlt über längere Zeit transportiert wird. Falls das wasser einen bestimmten

Nährstoffgehalt aufweist, können dabei neben Keimzahlanstiegen auch Erhöhungen der Coligehalte auftreten, welche ein ursprünglich hygienisch noch tragbares Wasser in ein zu beanstandendes mit Colinachweisen in 100 ml verwandeln.

Es schien daher von Interesse, die Vermehrungsfähigkeit von Reinkulturen der E. coli in Wasser bei verschiedenen Temperaturen und unterschiedlichem Nährstoffangebot unter definierten Bedingungen zu untersuchen.

B) Bisherige Beobachtungen über das Verhalten von E. coli in Wasser.

Die ersten Angaben über die untere Grenze der Vermehrungsfähigkeit von E. coli finden sich bei BARBER (1908). Der Autor gibt +10° C als unterste Grenze an. Eine schwache Vermehrung fand GRAHAM - SMITH (1920) noch bei + 8 bis + 10° C, während MURABITO (1932) die unterste Wachstumsgrenze nochmals etwas tiefer ansetzte. Bei seinen Untersuchungen zeigten nur wenige Colikeime bei +7° C ein Größenwachstum, und ganz selten erfolgte eine Teilung innerhalb von 2 bis 3 Tagen. Alle drei Autoren benutzten nährstoffreiche Flüßigkeiten bzw. Nähragarsubstrate. Skeptisch sind Berichte über Wachstum und Vermehrungsfähigkeit von E. coli bei noch niedrigeren Temperaturen zu beurteilen. HAINES (1934) z.B. berichtet von einem Bacterium coli - Stamm, der auf Nähragar bis -2° C Wachstum aufwies. Es liegt der Verdacht nahe, daß es sich bei solchen kältetoleranten Stämmen nicht um E. coli (Fäkaltyp) handelte, sondern um coliforme Organismen.

In nährstoffarmem Milieu, wie es z.B. Grundwasser darstellt, fanden CALDWELL und PARR (1933) sowie WEBSTER und RAGHAVACHARI (1935) eine Abnahme der Coli-Aerogenes-Bakterien, wenn die Proben unter Eiskühlung gehalten worden waren. JONES und Mitarbeiter (1950) untersuchten Wasserproben 2 Stunden nach der Entnahme und nach Kühl-

schrankaufbewahrung über Nacht bei +3 bis +5° C. Sie kommen ebenfalls zu dem Ergebnis, daß Coli-Aerogenes-Bakterien während der 18-stündigen Kälteperiode eine Verminderung erfahren haben. Da andererseits Berichte über eine Vermehrung von E. coli in Glasgefäßen (allerdings bei höheren Temperaturen) vorlagen, prüfte das ENGLISCHE PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE WATER SUBCOMMITTEE (1952 und 1953) das Verhalten von E. coli und von Coliformen in Wasserproben während der Aufbewahrung bei Zimmertemperatur und im Kühlschrank über Nacht. Von 111 quantitativ auf E coli untersuchten, über Nacht bei +3 bis +5° C aufbewahrten Proben, zeigten 7 eine Zunahme der Colizahl und 15 eine Abnahme, während der Rest unverändert blieb. Wurden die Proben bei Raumtemperatur aufbewahrt, so entstanden bei 8 Proben höhere, bei 29 nierigere Colizahlen. In Deutschland werden Wasserproben überwiegend in Thermosflaschen transportiert und aufbewahrt, da sich herausgestellt hatte, daß Keim- und Colizahlen dann die geringste Änderung erfahren, wenn die ursprünglichen Temperaturverhältnisse möglichst lange erhalten bleiben. Innerhalb von 12 Stunden ändern sich so behandelte Wasserproben nur unwesentlich in ihrem Keimgehalt (PAUL 1939).

Berichte über die Vermehrung von E. coli in Wasserproben bei Raum- und Bruttemperatur sind so gut fundiert, daß

an der Fähigkeit von E. coli, selbst bei minimalem Nährstoffangebot rege zu wachsen, nicht zu zweifeln ist. GARVIE (1955) stellte nach Einsaat von 890 E. coli in einen Phosphat - Puffer bei 37° C innerhalb von 24 Stunden eine Vermehrung auf 4100 und innerhalb von 48 Stunden auf 1,35 Millionen fest. BIGGER (1937) untersuchte die Vermehrung von E. coli in Flußwasser. Selbst bei Anwendung sehr kleiner Einsaaten (100 bis 400 Zellen/ml) fand er eine Zunahme der Keime innerhalb von 10 Tagen um fast drei Zehnerpotenzen, wenn die Bebrütungstemperatur 37° C betrug. Bei 22° C erreichten seine Versuchsansätze diese Werte bereits nach 5 Tagen. Aus der Tatsache, daß die Vermehrung bei 22° C rascher erfolgte, ist abzuleiten, daß bei 37° C verstärkt Absterbevorgänge aufgetreten sein müssen, denn eine Erhöhung der Temperatur von 22 auf 37° C hätte theoretisch zu einer rascheren Vermehrung bei 37° C führen müssen. Daß bei hohen Temperaturen tatsächlich höhere Absterberaten vorliegen, geht aus den Untersuchungen von COHEN (1922) hervor. Der Autor stellte bei Aussaat von 10^6 Colibakterien/ml in schwach gepuffertes, steril filtriertes Leitungswasser fest, daß die Absterberate bei 30° C höher lag als bei 20° C. Bei 10° C zeigte sie eine Höhe, die zwischen den 20 - 30°-Werten lag. Bei 0° C waren innerhalb von 30 Tagen keine

Veränderung der Colizahlen festzustellen.

Wachstum und Vermehrungsfähigkeit von E. coli in Wasserproben ist abhängig vom Gehalt des Wassers an Nährstoffen. Die erforderliche Menge kann sehr gering sein. Nach ALLEN und Mitarbeitern (1952) tritt bei 22° C bereits bei Zusatz von 5 ppm Bouillon -entsprechend 0,28 ppm organischer Substanz- Wachstum ein. Dabei ist es gleichgültig, ob dieser Betrag in dem Wasser bereits vorhanden ist oder erst durch autolytische Vorgänge der eingesäten Keime zustande kommt. Bei Einsaaten unter 10^5 - 10^6 Zellen/ml werden so geringe Mengen organischen Materials freigesetzt, daß keine Beeinflußung der Überlebenskurven resultiert. Erst ab 10^7 Zellen/ml machen sich autolytisch entstehende Nährstoffe in einer Verlängerung der Überlebensfähigkeit bemerkbar. Zu gleichen Ergebnissen kommen DEMELLO, KISLER und DANIELSON (1951) und SPANGLER und WINSLOW (1943). Daß es sich tatsächlich um gelöste Stoffe handelt, konnte von ALLEN und Mitarbeitern (1952) durch periodischen Austausch der Suspendierungsflüssigkeit und von BIGGER (1937) durch Konzentrierung und Wiederverdünnung der Nährstoffe nachgewiesen werden.

Bei Verwendung von Salz- und Pufferlösungen machen sich bereits die selbst in reinen Chemikalien enthaltenen geringen Kohlenstoff- und Stickstoffmengen bemerkbar.

GARVIE (1955) spricht von der Unmöglichkeit, die für das Wachstum von 1 Million Keimen benötigte minimale Stickstoff- und Kohlenstoffmenge (weniger als 0,1 Mikrogramm Stickstoff und Kohlenstoff) von den Versuchsansätzen fernzuhalten.

Eine Reihe von Arbeiten deuten darauf hin, daß für das Zustandekommen von Wachstum und Vermehrung bei Colikeimen nicht nur organisch gebundener Stickstoff und Kohlenstoff verantwortlich zu machen sind. Bereits BIGGER (1937) vermutete nach den Ergebnissen der chemischen Analyse, daß die in seinen Versuchen zur Colivermehrung führenden Substanzen Ammoniumnitrat und Hexosane darstellen. Der in dieser Form vorliegende Stickstoff trat in der Größenordnung von 0,00114 g/100 ml Wasser auf. Da die bei den gleichen Versuchen ermittelte niedrigste Peptonkonzentration, die noch Vermehrung ergab, bei 0,0032 g Stickstoff/100 ml Wasser lag, folgerte BIGGER, daß der im Wasser vorliegende Stickstoff für das Bakterium coli besser ausnutzbar sei als der Pepton - Stickstoff. Später konnten BIGGER und NELSON (1941 und 1943) nachweisen, daß E. coli selbst in Aqua dest. zur Vermehrung befähigt ist, wenn ihm als Stickstoffquelle Ammoniak und als Kohlenstoffquelle CO_2 zur Verfügung steht. Voraussetzung ist allerdings, daß in dem

Medium gleichzeitig Talkum und ein anderes fein verteiltes und poröses anorganisches Material vorhanden ist. Die Bedeutung dieser letzten Bedingungen für die Ausnutzung extrem niedrig konzentrierter Nährstoffe wurde zuerst von HEUKELEKIAN und HELLER (1940) erkannt und von ZOBELL (1943) und ZOBELL und GRANT (1943) ausführlich untersucht. Die Umwandlung von Ammoniak in Aminogruppen durch E. coli wurde von HALPERN und UMBARGER (1940) beschrieben. Sie findet bereits in einem einfachen Glukose - Mineralsalz - Medium statt. Auf die Rolle einfacher Stickstoff - Quellen im Verwendungsstoffwechsel von E. coli hatten bereits früher H. BRAUN und Mitarbeiter (1921) sowie CARPENTER und Peterson (19..) hingewiesen. Aus späteren Untersuchungen von KURZWELL (19.) geht hervor, daß E. coli seinen Stickstoff- und Kohlenstoffbedarf sogar einzig und allein aus gasförmigen Quellen, d.h. aus atmosphärischem Stickstoff und aus Kohlensäure decken kann.

Die meisten in der Literatur berichteten Beobachtungen betrafen die "Vermehrung" oder das "Wachstum" von Colibakterien, d.h. es wurden die Zahlen der jeweils lebenden Zellen bestimmt. Trotz sinkender Colizahlen sind aber Vermehrungen bzw. Teilungen denkbar. Sie können lediglich

auf Grund einer größeren Absterbegeschwindigkeit der Gesamtpopulation nicht in Erscheinung treten. Ablaufende Teilungsvorgänge lassen sich daher nur über die Gesamtzahl lebender u n d toter Bakterien bestimmen, d.h. auf dem Wege der Direktzählung. Zur Klärung der Frage, ob E. coli in nativem Grundwasser zur Teilung befähigt ist und wo gegebenenfalls die untere Temperaturgrenze zu suchen ist, wandten wir daher diese letztere Methode an.

C) Eigene Untersuchungen

1) Vorbereitung des Keimmaterials

Bei den Untersuchungen fand ein frisch aus Fäzes isolierter Stamm von E. coli Verwendung. Er wurde vor Versuchsbeginn jeweils in mindestens zwei Fleischwasserbouillon - Passagen gezüchtet. Die für die Versuche benötigten Keime der logarithmischen Wachstumsphase wurden durch drei Stunden Züchtung bei 37° C und weiteren drei Stunden bei 22° C in Fleischwasserbouillon und nachfolgendes zweimaliges Waschen mit sterilem Aqua dest. erhalten.

Um einzeln liegende Keime zu erzielen, war nach dem Waschvorgang eine Homogenisierung der Keimaufschwemmung nötig. Mixgeräte mit metallischem Rührschaft erwiesen sich dabei als ungeeignet, da durch Abrieb von Metall- und Labermaterial große Mengen kleiner Partikel in die Aufschwemmung eingebracht wurden, welche die Keimauszählung empfindlich störten.

Auch die Verwendung eines im Zentrifugenröhrchen hochtourig bewegten Glasrührstabes führte zu Partikelbildung. Die dabei von den Gefäßwandungen abgeschlagenen feinen Glassplitter lagen zum größten Teil in der Grössenordnung der zu zählenden Bakterien. Erfolg hatte erst die Verwendung eines 1,5 mm starken, gekröpften Platin-

drahtes, der in das Handstück einer zahnärztlichen Bohrmaschine eingespannt wurde. Ein störender Abrieb von Glas oder Metall war durch dieses Vorgehen ausgeschaltet, auch die Sterilisation gestaltete sich durch Ausglühen des Drahtes einfach.

Keimaufschwemmungen, die trotz Homogenisierung noch größere Keimaggregationen erkennen ließen, wurden verworfen. Vereinzelte Keimanhäufungen bis zu 15 Keimen wurden noch toleriert, da sie relativ leicht unter dem Mikroskop auszählbar sind.

2) Versuchsanordnungen zur Feststellung der Zellteilung

a) Anwendung der Membranfiltermethode

Eine Versuchsanordnung zur Feststellung der Vermehrung von E. coli in Wasser kommt den natürlichen Verhältnissen umso näher, je weniger Keime/ml Wasser eingesät werden. Eine völligen Angleichung an natürliche Verhältnisse ist im Laborversuch jedoch nicht zu erreichen. Wenn unter natürlichen Bedingungen höchstens einige E. coli/ml Wasser zu erwarten sein werden, so müssen im Modellversuch mindestens 10 000 bis 100 000/ml angewandt werden, um mit dem Membranfilterverfahren oder der Anreicherung durch Zentrifugation statistisch auswertbare Colizahlen zu erhalten.

Die Versuche wurden in 1,5 l - Dreihalskolben durchge-

führt, welche bis zu den Halsansätzen in Temperierbäder tauchten. Durch die weite, mittlere Offnung führte ein Glasrührstab, der über eine Schaltuhr je 2o Minuten in Betrieb gesetzt wurde und anschließend 4o Minuten ruhte. Durch die zweite, kleinere Offnung reichte ein Thermometer in die Kolbenflüßigkeit, während die dritte, ebenfalls kleinere Offnung der Beimpfung und Probenentnahme diente. Die gesamte Vorrichtung wurde nach Sterilisation mit Äthylenoxyd unter sterilen Kantelen zusammengesetzt und mit 1,5 l sterilfiltriertem Brunnenwasser des Wasserwerkes Erlangen West gefüllt.

Auf die Beimpfung mit der Coliaufschwemmung folgte nach 2o Minuten ihren die erste Probenentnahme. Die übrigen Proben wurden in 24 - stündigen Abständen gezogen.

Zuerst wurde versucht, durch Membranfiltration einer größeren Wassermenge (1oo - 2oo ml) den Keimgehalt anzureichern und auf einer kleinen Fläche zu konzentrieren. Verwendung fanden Membranfilterscheiben der Membranfilter GmbH Göttingen, Gruppe 6, mit 5o mm Durchmesser, die in einem partikelfrei gereinigten Filtrationsgerät "Coli 5" eingespannt waren.

Entsprechend den Empfehlungen der Membranfiltergesellschaft und verschiedener Literaturangaben zufolge wurden die keimbeladenen Filter zunächst mit Formaldehyd

fixiert, dann getrocknet und schließlich auf mit Methylenblau getränkte Filterpapierstreifen gelegt. 15 - 30 Minuten Färbezeit erwiesen sich als günstig. Von den erneut getrockneten Filterscheiben wurden anschließend kleine Flächen an verschiedenen Stellen herausgestanzt und in Immersionsöl unter dem Mikroskop betrachtet. Die Colikeime erschienen als schwach angefärbte Stäbchen auf dem ebenfalls bläulich angefärbten Hintergrund des Filters.

Die Auszählung bereitete bei Keimen, die bis zu 24 Stunden in Wasser suspendiert waren, keine Schwierigkeit. Nach zwei und mehr Tagen aber traten immer häufiger Farblücken auf. Auf diese Erscheineung wurde schon durch JANNASCH (1955) hingewiesen. Nach drei Tagen war in der Regel nicht mehr zu unterscheiden, ob aneinanderliegende kokkoide Gebilde ein einzelnes Stäbchen darstellten, dessen einzelne Bezirke durch Farblücken getrennt waren, oder ob es sich um Teilungsformen, d.h. um Ausdruck einer Vermehrung handelte.

Etwas bessere Ergebnisse brachte das eigene Färbeverfahren, das sich auf die Anfärbbarkeit von Eiweiß durch Amidoschwarz B stützt:

Von einer partikelfrei filtrierten 1% igen wässrigen

Lösung von Amidoschwarz B wurden 5 ml zu loo ml Keimsuspension hinzugefügt und die gesamte Lösung nach lo - minütigem Stehen durch ein Membranfilter gesaugt. Überschüssige Farbe konnte durch zweimaliges Waschen mit je 1 ml lo% iger Essigsäure entfernt werden.

Mit Hilfe dieses Färbeverfahrens waren die Keime auf Grund der kräftigeren Anfärbung und des besseren Kontrastes auch nach 3-tägiger Suspensionsdauer noch auszählbar.

Darüberhinaus führte aber auch diese Färbemethode zu unbefriedigenden Ergebnissen.

b) Auszählung in Zählkammern nach Anreicherung durch Zentrifugation.

Bei Direktbeobachtung im Phasenkontrastmikroskop treten auch bei längerer Suspensionsdauer keine den Farblükken entsprechende Äquivalente auf. Es schien daher angezeigt, für Versuche, die sich über längere Zeiträume erstrecken sollten, die färberische Darstellung der Keime zu verlassen und die Direktmikroskopie nach dem Phasenkontrastverfahren anzuwenden. Da hierbei eine Anreicherung über Membranfilterscheiben ausschied, stand zur Keimkonzentrierung nur die Methode der Z e n t r i f u g a t i o n zur Verfügung.

Wir führten sie in 15 ml fassenden, auf 0,1 ml graduierten Zentrifugenröhrchen bei 4500 Upm wänrend 30 Minuten aus. Um Keimverlust zu vermeiden, wurde der auszentrifugierte Uberstand nicht abgekippt, sondern vorsichtig abgesaugt. Das gleiche Röhrchen wurde noch 2 - 4 mal mit dem keimhaltigen Wasser gefüllt, um den Keimgehalt aus 30 bzw. 60 ml zu erfassen.

Nach der letzten Zentrifugation wurde auf 0,3 ml aufgefüllt, mit dem Platindraht homogenisiert und die leicht getrübte Aufschwemmung in 0,01 mm hohen Zählkammern ausgezählt.

Die während der Auszählung störende Eigenbeweglichkeit konnte durch Abtötung der Keime mit Formaldehyd beseitigt werden.

Diesem methodischen Verfahren haftete jedoch der Nachteil an, daß die Keimeinsaat im Vergleich zu der Membranfiltermethode um eine Zehnerpotenz höher gewählt werden mußte, und daß die Zählgenauigkeit durch den mehrfachen Pipettier- bzw. Meßfehler erheblich belastet sein mußte. Besonders die Auffüllung des Zentrifugates auf 0,3 ml brachte bei der Glasdicke der Zentrifugenröhrchen und der Feinheit der Graduierung stets einen beträchtlichen Fehler mit sich.

Die mit dieser Methode erzielten Ergebnisse befriedigten ebensowenig wie die Ergebnisse der Membranfiltertechnik.

c) Langfristige Direktbeobachtung in Zählkammern

Um die Schwierigkeiten bei der quantitativen Auswertung zu verringern, legten wir Zählkammerkulturen von E. coli in sterilfiltriertem Brunnenwasser an. Verwendung fanden übliche Kammern nach THOMA mit 0,1 mm Höhe. Um eine Austrocknung der eingebrachten Keimsuspension zu verhindern, wurden die Zählquadrate mit steriler weißer Medizinalvaseline umschlossen und die Deckgläser zusätzlich mit Bienenwachs umrandet (Abb.1).

Bei Beobachtung mit dem Phasenkontrastmikroskop (Objektiv 40 und Okular 8x) blieben die Colikeime während der teilweise 14-tägigen Beobachtungszeit stets einwandfrei zählbar. Die Eigenbeweglichkeit störte nur bei Versuchen, die über 12° C durchgeführt wurden.

Die Inkubation der Zählkammer erfolgte auf dem Tisch eines Mikroskopes, das in einem Temperierschrank untergebracht worden war. Die Regelgenauigkeit des Schrankes betrug ± 0,1° C. Temperaturschwankungen wurden dadurch vermieden, daß das Mikroskop während der Auswertung stets

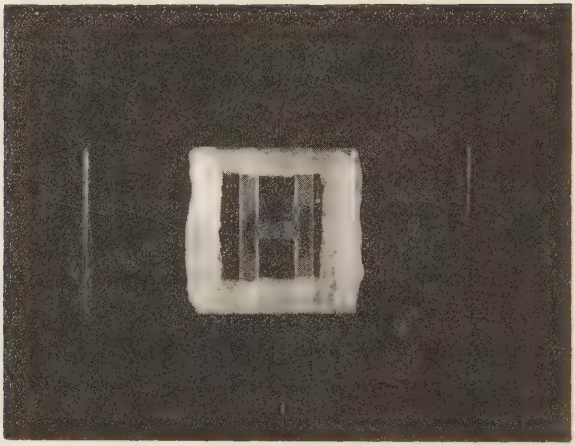


Abb.1: Zählkammer mit Vaseline und Bienenwachs wasserdicht verschlossen.

im Temperierschrank verblieb. Lediglich die Okulare wurden durch eine Plastikfolie hindurch nach außen geführt. Die Bedienung der Mikrometerschraube sowie alle sonstigen Handgriffe am Mikroskop wurden mit Gummihandschuhen vorgenommen, die nach Art einer "Glove box" in die Frontscheibe des Temperierschrankes eingeklebt worden waren (Abb, 2 und 3).

Eine dauernde Luftumwälzung im Temperierschrank sorgte dafür, daß während der relativ kurzen Zeit des Auszählens die durch das Mikroskopieren gebildete wärme ständig von Mikroskop und Präparat abgeführt wurden.

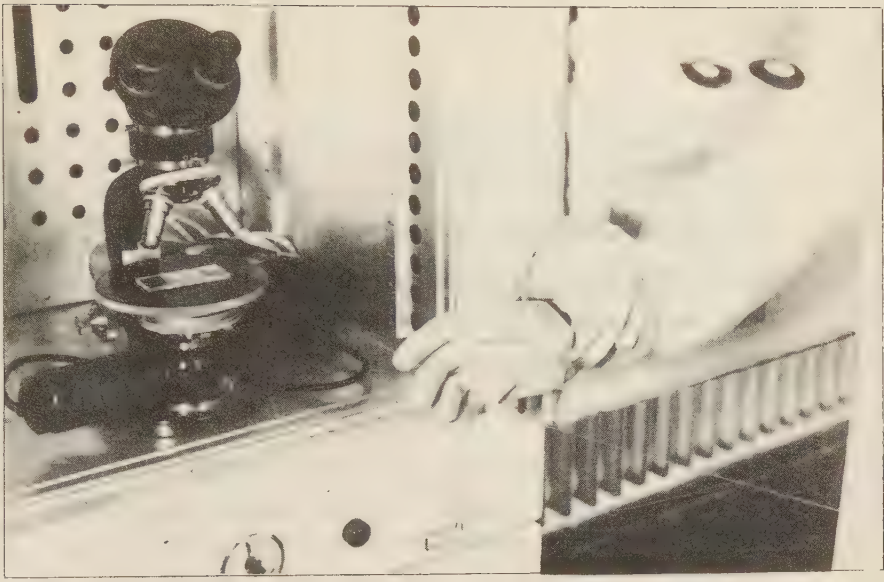


Abb.2: Temperierschrank zum Einlegen der Zählkammer geöffnet.

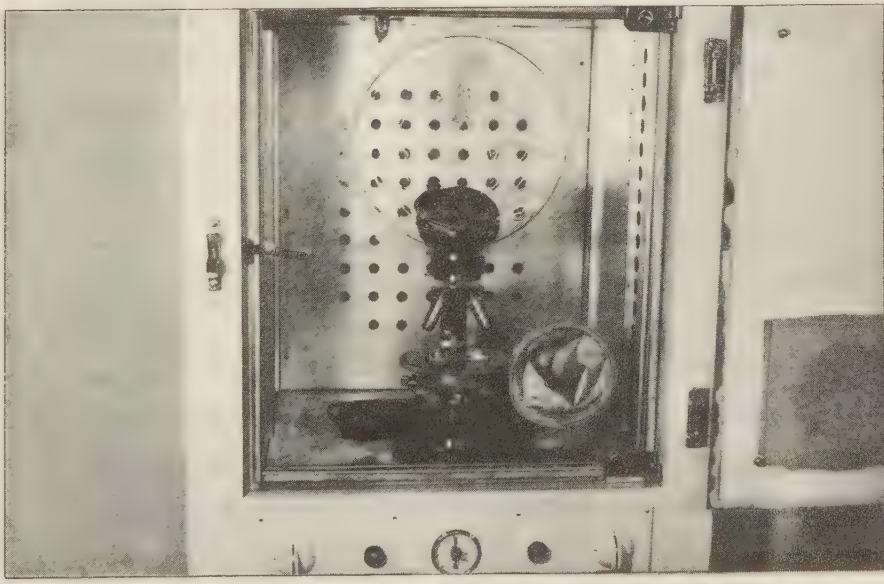


Abb.3: Temperierschrank während des Versuchs

Die Zählkammern nach THOMA weisen 256 Quadrate zu je 1/4oo mm^3 auf. Sämtliche Quadrate wurden in 12- bzw. 24-stündigen Abständen ausgezählt. Um in den einzelnen Quadraten von $2o^{-3}$mm Kantenlänge 5-1o Keime zu erzielen, waren Keimdichten von 10^7 Keimen/ml nötig. Die angewandten Keimaufschwemmungen lagen also in ihrem Keimgehalt noch höher als bei den bisher geschilderten Versuchen.

Durch Änderung der Inkubationstemperatur und durch Zusätze zum Brunnenwasser, in welchem die Keime suspendiert waren, gelangten wir zu verschiedenen Versuchsansätzen, deren Ergebnisse im folgenden wiedergegeben werden.

D) Ergebnisse der Direktbeobachtung

1) Versuche mit Aqua dest. als Suspensionsmedium

Bei Aussaat der Keime in sterilem Aqua dest. wurde während einer Beobachtungszeit von 11 Tagen keine Vermehrung festgestellt. Die Zahl der Colikeime nahm im Gegenteil von 18o auf ca. 15o ab (Kurve 1).

Wir führen die Abnahme auf die keimschädigende Wirkung des destillierten Wassers zurück.

2) Versuche mit Brunnenwasser als Suspensionsmedium

Da die Verwendung von Aqua dest. nicht den in der Natur gegebenen Bedingungen entspricht, gingen wir bei den folgenden Versuchen zur Verwendung von natürlichem, sterilfiltriertem Brunnenwasser über. In diesem Milieu ließen sich die eingesäten Keime während einer Beobachtungszeit von 14 Tagen ohne Veränderung ihrer Zahl nachweisen (Kurve 2). Der Kurvenverlauf läßt allerdings bei diesem Versuch zwischen dem 4. und 6. Tag ein Ansteigen der Bakterienzahl erkennen. Dieser Vorgang wird erklärt durch einen kurzfristig erfolgten Ausfall der Kühleinrichtung, so daß die Keime möglicherweise bis zu zwölf Stunden einer höheren Temperatur ausgesetzt waren. In dieser Zeit kann die festgestellte Bakterienzahlzunahme, die über den 6. Tag hinaus nicht mehr wirksam war, vor sich gegangen sein. Der Versuch läßt jedoch

erkennen, daß bei einer Temperatur von 8° C über längere Zeiträume hinweg keine Veränderung der Bakterienzahl stattfindet.

Selbst bei einer Erhöhung der Temperatur auf 10° C trat ebenfalls keine Bakterienzahlzunahme ein (Kurve3).

Die in den Tabellen 2 und 3 angegebenen Beobachtungszeiten wurden später nochmals erweitert.

Auch während einer 17-tägigen Beobachtungszeit ließ sich weder bei 8° noch bei 10° C eine Veränderung der Bakterienzahl erkennen (Kurve 6).

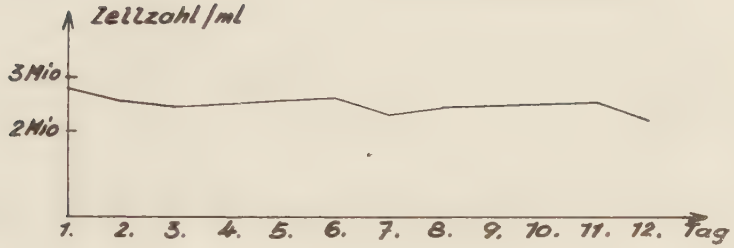
Da bei diesen Versuchen 256 Quadrate der Zählkammer ausgezählt wurden, kann sich dieses Ergebnis auf ein statistisch ausreichend gesichertes Zahlenmaterial stützen. Die Verteilung der Bakterien auf die einzelnen Zählquadrate war sehr gleichmäßig. In Tabelle 1 sind für den in Kurve 6 dargestellten Versuch die für beide Temperaturen ermittelten Absolutwerte ausgezählter Zellen und die pro Zählquadrat vorhandenen Zellzahl einschließlich der Angabe des mittleren Fehlers des Mittelwertes σ_M aufgeführt.

Bei weiterer Steigerung der Temperatur ist festzustellen, daß ab 14° C deutliche Teilungsvorgänge ablaufen. Innerhalb einer Woche kommt es zu einer Verdopplung der ein-

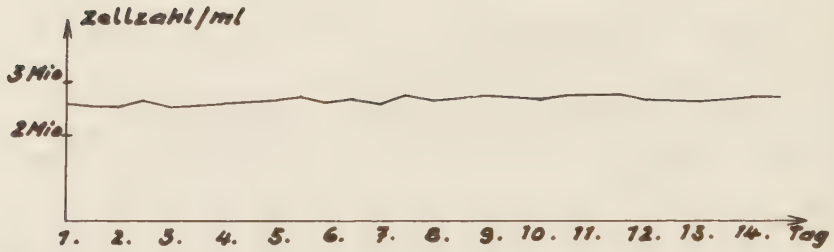
gesäten Keime (Kurve 4). Bei 18° bzw. 20° C verlaufen die Kurven flacher. Dies würde bedeuten, daß in der Zeiteinheit weniger Teilungen ablaufen als bei 14°und 16° C. Angesichts der bei 18° und 20° C schon sehr starken Eigenbeweglichkeit der Keime jedoch, die die Auszählung mit einem nicht unbedeutenden Fehler behaften mußte, erscheint eine solche Aussage nicht genügend gesichert.

Versuchstag	8°C Zellzahl/ml	Zellzahl/Zählquadrat unter Angabe des mittleren Fehlers des Mittelwertes	10°C Zellzahl/ml	Zellzahl/Zählquadrat unter Angabe des mittleren Fehlers des Mittelwertes
1	$29{,}2 \cdot 10^6$	$6{,}72 \pm 0{,}18$	$28{,}3 \cdot 10^6$	$6{,}50 \pm 0{,}17$
3	$27{,}6 \cdot 10^6$	---	$28{,}2 \cdot 10^6$	---
5	$27{,}6 \cdot 10^6$	---	$28{,}7 \cdot 10^6$	---
7	$27{,}0 \cdot 10^6$	---	$27{,}8 \cdot 10^6$	---
9	$27{,}4 \cdot 10^6$	$6{,}88 \pm 0{,}24$	$28{,}0 \cdot 10^6$	$7{,}12 \pm 0{,}22$
11	$27{,}9 \cdot 10^6$	---	$28{,}5 \cdot 10^6$	---
13	$26{,}9 \cdot 10^6$	---	$28{,}0 \cdot 10^6$	---
15	$26{,}4 \cdot 10^6$	---	$28{,}2 \cdot 10^6$	---
17	$26{,}5 \cdot 10^6$	$6{,}76 \pm 0{,}24$	$28{,}5 \cdot 10^6$	$7{,}14 \pm 0{,}22$

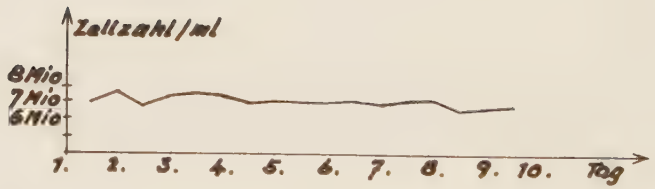
Tab. 1: Zellzahl von E. coli in Brunnenwasser bei 8°C und 10°C während 17-tägiger Beobachtungszeit. Angabe der absoluten Zellzahlen und der Zahl der pro Zählquadrat ausgezählten Keime.



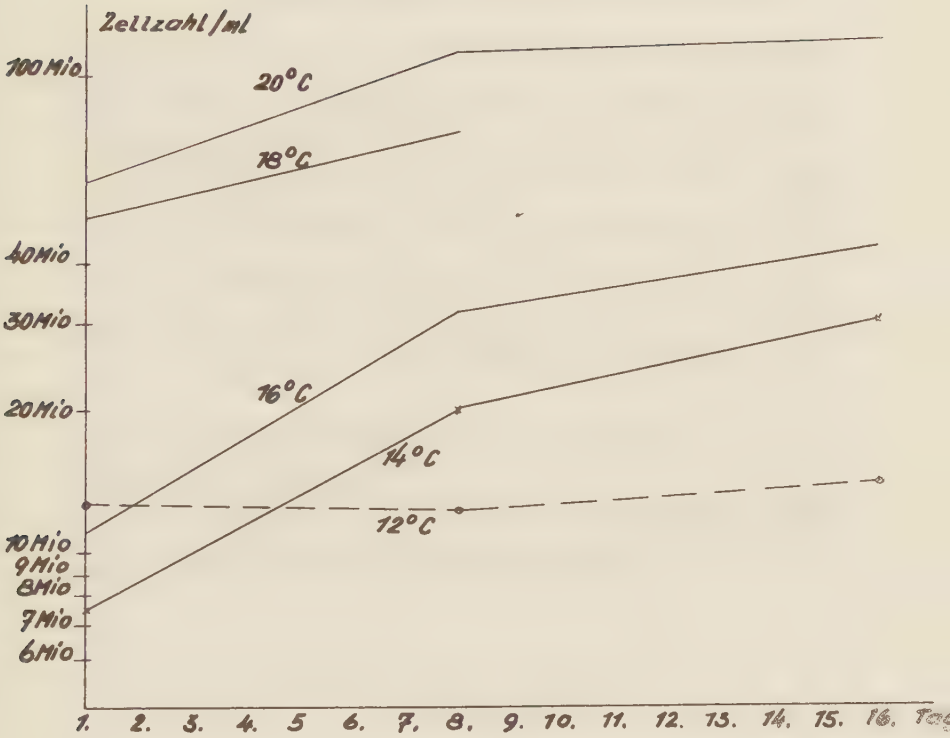
Kurve 1: Teilung von E. coli in sterilem Aqua dest. bei 8° C.



Kurve 2: E. coli in sterilfiltriertem Brunnenwasser



Kurve 3: E. coli in sterilfiltriertem Brunnenwasser bei 10° C.

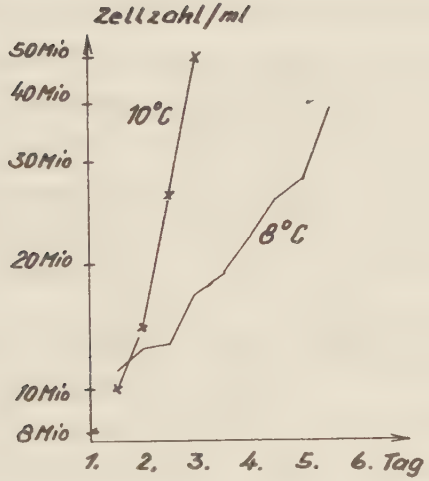


Kurve 4: Teilungen von E. coli in sterilfiltriertem Brunnenwasser bei 12°C, 14°C, 16°C, 18°C und 20°C.

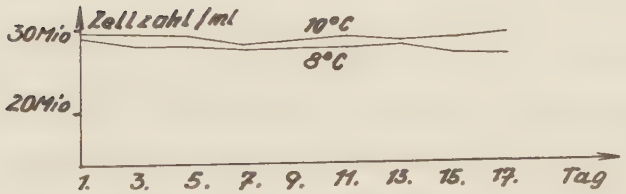
3) Versuch mit Bouillon als Suspensionsmedium

Anders liegen die Verhältnisse, wenn statt des Brunnenwassers Bouillon als Suspendierungsmedium benutzt wird. Bereits nach 60 Stunden ist in diesem Fall eine Verdopplung der Keime bei einer Temperatur von 8°C möglich. Liegt die Temperatur bei 10°C, so vermehren sich die Keime in 36 Stunden auf das Fünffache (Kurve 5). Die gleichzeitig angesetzte Kontrolle mit Brunnenwasser zeigt keine Teilungsvorgänge (Kurve 6).

Bei Bouillon prüften wir Temperaturbereiche unter 8° C nicht, da uns in erster Linie die Vermehrung in nährstoffarmen Flüßigkeiten interessierte, welche nach den oben genannten Versuchen erst bei +14° C in Erscheinung tritt.



Kurve 5: E. coli in Bouillon bei 8°C und 10°C.



Kurve 6: E. coli in Brunnenwasser bei 8°C und 10°C.

4) Förderung der Zellteilung durch Nährstoffe bei niedrigen Temperaturen

Wassertemperaturen von 14° C und darüber in einem einwandfreien Grundwasser können als große Seltenheit betrachtet werden. Es ist daher nicht damit zu rechnen, daß in einem guten Grundwasser Vermehrungen von Colibakterien stattfinden. Anders dürften die Verhältnisse liegen, wenn es sich um ein Wasser handelt, welches Nährstoffe in wechselnder Menge und Qualität enthält. Solche Verhältnisse liegen z.B. bei uferfiltrierten Wässern vor, wo häufig auch zusätzlich die Temperatur erhöht ist.

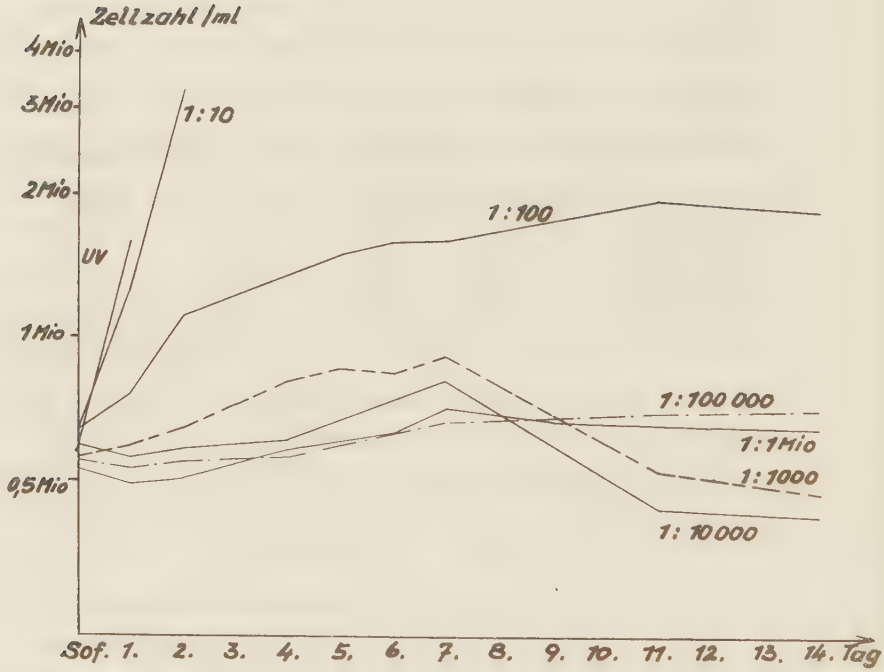
Die weiteren Versuche hatten daher zum Ziel, die untere Grenze von Nährstoffen zu ermitteln, welche noch Vermehrungsmöglichkeit bei niederen Temperaturen bietet. Wir setzten bei reinem Brunnenwasser zunächst Bouillonmengen in steigender Konzentration zu und inkubierten die Suspension bei einer in Brunnenwasser mit Sicherheit nicht wachstunsfördernden Temperatur.

Dabei zeigte sich, daß beriets ein Bouillonzusatz von 1 ppm entsprechend 0,02 ppm organischer Substanz in den ersten sieben Tagen eine schwache Wachstumsförderung erkennen läßt. Bei Beobachtung während einer weitern Woche ist dann jedoch keine Zunahme der Zellzahlen festzustellen. Mit steigendem Bouillongehalt nimmt die Vermehrung

innerhalb der ersten Woche zu, jedoch ist selbst bei einem Zusatz von 1% Bouillon (entsprechend 200 ppm organischer Substanz) nur eine Verdopplung bis Verdreifachung der Bakterienzahl in diesem relativ langen Zeitraum nachzuweisen.

Bei Ausdehnung der Beobachtung über 7 Tage hinaus kann auch hier kein wesentlicher Anstieg der Bakterienzahl nachgewiesen werden.

Bei Erhöhung des Bouillonzusatzes auf 10% (= 2000 ppm organischer Substanz) kam jedoch eine so starke Vermehrung in Gang, daß nach 2- tägiger Beobachtungszeit die Einsaat verfünffacht war und eine spätere Auszählung der Zählkammern nicht mehr möglich war (Kurve 7).



Kurve 7: E. coli in reinem Brunnenwasser, dem Bouillonmengen in steigender Konzentration zugefügt wurden. (10°C)

Da E. coli entsprechend den eingangs zitierten Literaturangaben nicht nur organisch gebundenen Stickstoff für seine Wachstumsprozesse nutzbar machen kann, sondern auch mineralischen Stickstoff verwertet, ersetzten wir den Bouillongehalt in Anlehnung an das von BIGGER (1937) wahrscheinlich gemachte wachstumsfördernde Prinzip des Flußwassers durch Glukose und Ammoniumchlorid. Bei einem gleichbleibenden Glukosegehalt von 0,5g/l und fallenden NH_4Cl - Werten von 0,5 bis 0,0005 g/l (=500 - 0,5 ppm) waren während einer Beobachtungsdauer von 15 Tagen nur unwesentliche Veränderungen der Bakterienzahl festzustellen (Kurve 8a-e).

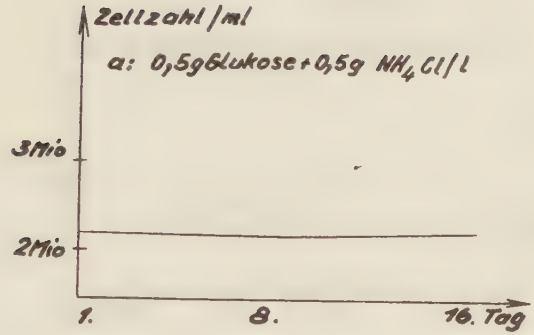
Bei gleichbleibend hohem NH^4Cl - Gehalt von 0,5 g/l und fallender Glukosekonzentration konnte jedoch bei den Glukosewerten 0,005 und 0,0005 g/l (= 5 und 0,5 ppm) eine deutliche Teilungsbereitschaft festgestellt werden (K.9a-d).

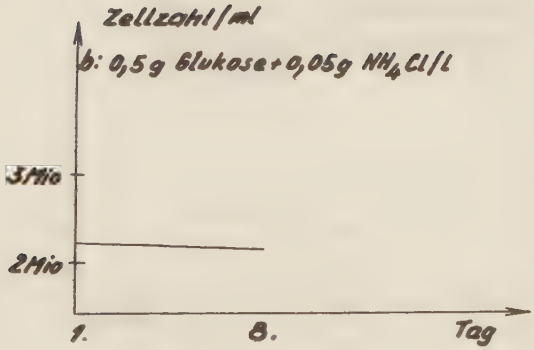
Auffallend ist, daß bei einem NH_4Cl - Gehalt von 0,5 g/l und relativ hohen Glukosekonzentrationen keine Vermehrungsvorgänge eingetreten sind. Es muß dahingestellt bleiben, ob eine osmotische Wirksamkeit oder eine Beeinflußung des Zellstoffwechsels selbst dafür verantwortlich ist.

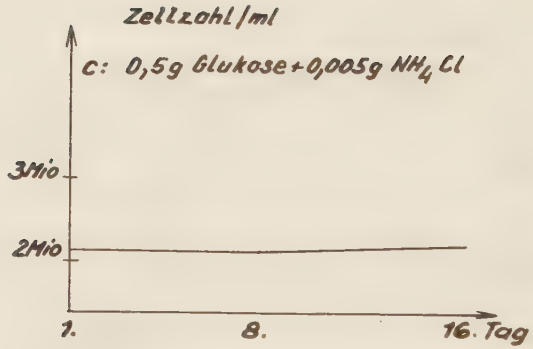
Im ganzen gesehen geht jedoch aus diesen Versuchen hervo daß bei Anwesenheit relativ hoher NH_4Cl - Mengen schon geringe Kohlehydratgehalte eine Zellteilung fördern,

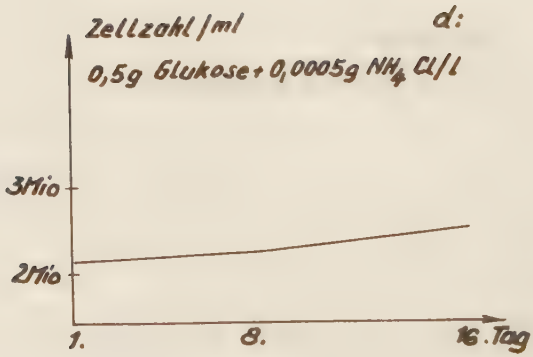
während eine solche bei relativ hohem Kohlehydratangebot und geringem Stickstoffgehalt des Wassers unterbleibt.

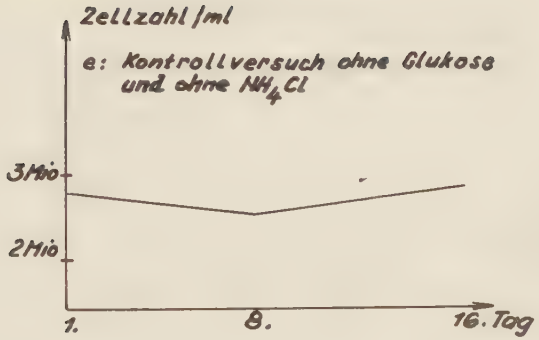
Gemessen an den zur Erzielung eines Teilungseffektes notwendigen Mengen anorganischen Stickstoffs und organisch gebundenen Kohlenstoffs wirkt sich der Bouillonzusatz wesentlich teilungsfördernder aus. Dies ist darauf zurückzuführen, daß in letzterem die für den bakteriellen Stoffwechsel nutzbaren Stickstoff-haltigen Substanzen bereits in organischer Form vorliegen.


Zellzahl/ml
a: 0,5g Glukose + 0,5g NH_4Cl/l
3Mio
2Mio
1.
8.
16. Tag

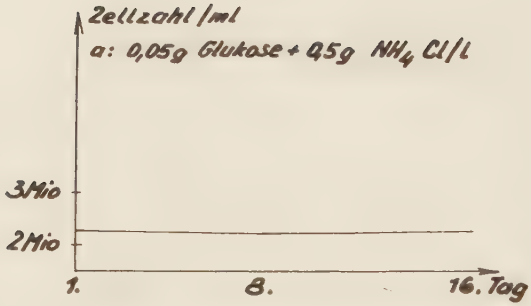

Zellzahl/ml
b: 0,5g Glukose + 0,05g NH_4Cl/l
3Mio
2Mio
1.
8.
Tag

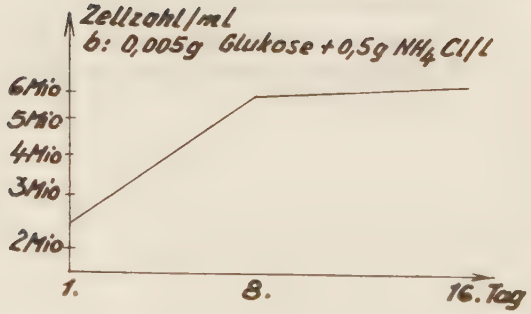

Zellzahl/ml
c: 0,5g Glukose+0,005g NH_4Cl
3Mio
2Mio
1.
8.
16. Tag

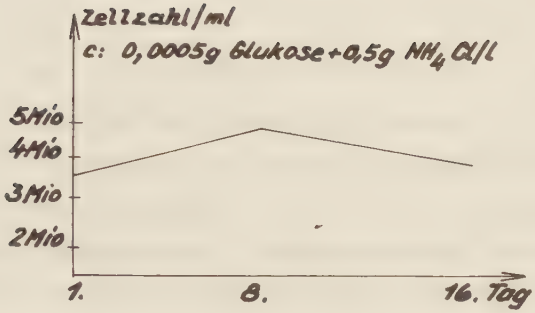

Zellzahl/ml
d:
0,5g Glukose+0,0005g NH_4Cl/l
3Mio
2Mio
1.
8.
16. Tag

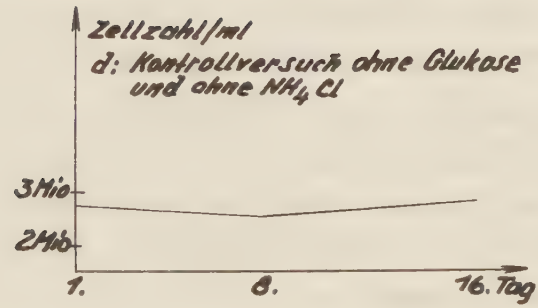


Kurven 8a-e: Teilung von E. coli bei 10°C in Brunnenwasser bei Anwesenheit relativ hoher Glukosemengen (0,5 g/l = 500 ppm) und abgestuftem anorganischen Stickstoff.


Zellzahl/ml
a: 0,05g Glukose + 0,5g NH_4Cl/l
3Mio
2Mio
1.
8.
16. Tag


Zellzahl/ml
b: 0,005g Glukose + 0,5g NH_4Cl/l
6Mio
5Mio
4Mio
3Mio
2Mio
1.
8.
16. Tag





Kurven 9a-d: Teilung von E. coli bei 10°C in Brunnenwasser bei Anwesenheit relativ hoher Konzentrationen an anorganischem Stickstoff (0,5g NH_4Cl/l = 500 ppm) und abgestuften Glukosemengen.

E) D i s k u s s i o n

Selbst in einem nährstoffarmen Wasser, wie es z.B. ein hygienisch einwandfreies Grundwasser darstellt, kommt es bei geeigneter Temperatur zu Teilungen. Als unterste Grenze wurde im Versuch 14°C festgestellt. Bei dieser Temperatur ist eine schwache Teilungstätigkeit von E. coli innerhalb von 8 Tagen statistisch zu sichern.

Bei höheren Temperaturen, zwischen 16° und 20°C, nimmt die Teilungstätigkeit jedoch nicht weiter zu, d.h. pro Zeiteinheit teilen sich bei 14°C in Brunnenwasser ebensoviele Zellen wie bei 20° C. Die Teilungen sind auch im wesentlichen bereits nach sieben Tagen abgeschlossen.

Diese Tatsachen lassen sich in der Weise deuten, daß Zellen mit größerer Masse unter dem Reiz ungünstiger Umweltsbedingungen in jeweils kleinere Tochterzellen aufgeteilt werden. Damit wird erreicht, daß zum Überleben der Keimpopulation möglichst viele Individuen ausgebildet werden, so daß die Chance, daß wenigstens einige Individuen überleben, größer wird. Diese Erscheinung erinnert an das aus der Botanik bekannte Phänomen der Notreifung. Fruchtansatztragende Pflanzen, die z.B. infolge Austrocknung unmittelbar vom Absterben bedroht sind, bringen ihre Samen in verkürzter Zeit zur Reifung,

wobei die einzelnen Samen kaum mehr eine Massenzunahme erfahren, sondern lediglich ausdifferenziert werden.

Wenn die in den Bakterienzählkammern beobachteten Teilungen als reine Aufteilung der Zelle ohne Neugewinn von Zellsubstanz durch assimilierende Prozesse erfolgen, müssen Zellen, die ursprünglich Stäbchen- oder Kurzstäbchenform erkennen ließen, nach Ablauf der Teilungen fast durchwegs kokkoide Formen aufweisen. Dies ist in der Tat der Fall. Wir konnten diese Beobachtungen stets treffen.

Die für die Teilungen nötige Energie kann in gleicher Weise aus Nährsubstanzen des wassers (siehe die eingangs zitierte Literatur), wie aus dem endogenen Stoffwechsel der Bakterien selbst stammen. STRANGE und Mitarbeiter (1961), die den endogenen Stoffwechsel von Aerobacter aerogenes studierten, kamen zu dem Ergebnis, daß bei fehlender Substratzufuhr zunächst Glykogen, dann aber auch Proteine und schließlich Nukleinsäuren angegriffen werden.

Hauptursache für Teilungen in Brunnenwasser ist also nicht die Anwesenheit von minimalen Nährstoffmengen, sondern in erster Linie die T e m p e r a t u r, welche den Ablauf bestimmter, die Zellteilung steuernder, Stoffwechselleistungen beeinflußt. Es handelt sich um Teilungsvorgänge, die auf Grund des endogenen, in seinem Ausmaß von der Temperatur abhängigen, Bakterienstoffwechsels zustande kommen.

Bei Suspendierung der Keime in Bouillon liegen andere Verhältnisse vor. Die Bouillon bietet die verschiedensten Nährstoffe in leicht verwertbarer Form, so daß auch bei niedrigeren Temperaturen eine rege Stoffaufnahme und ein Aufbau von Zellsubstanz zustande kommt. Dies wird bereits bei direkter Betrachtung der Keime in Bouillonkulturen bei 8° und 10°C deutlich. Die Keime sind selbst bei langer Beobachtungszeit größtenteils stäbchenförmig und selbst dort, wo kokkoide Formen vorliegen, in ihrer Masse größer als die in Brunnenwasser suspendierten Individuen.

Trotz reger Teilungsvorgänge(bei 8°C kommt es innerhalb von 4 Tagen zu einer Vermehrung auf das Drei- und Vierfache) ist also bei Angebot großer Nährstoffmengen eine echte Zunahme der Zellsubstanz bei der relativ niedrigen Temperatur von 8° C nachweisbar.

Dieses Verhalten betrifft jedoch nur reine bzw. gering verdünnte Bouillon. In einem Brunnenwasser, dem lediglich 1% Bouillon zugesetzt ist, werden zwar innerhalb von 8 Tagen ebenfalls Teilungen festgestellt, jedoch liegen diese in der gleichen Größenordnung wie die Teilungen in reinem Brunnenwasser.

Für die Praxis ist also anzunehmen, daß sich frei im Wasser suspendierte E. coli - Keime in Brunnen, Rohrleitungen, Versandgefäßen und auch in einem relativ reinen Oberflächen-

wasser nur insoweit teilen werden, als ihr endogener Nährstoffvorrat dies zuläßt. Es ist nämlich nicht anzunehmen, daß den Keimen im freien Wasser mehr als 200 ppm organischer Substanz zur Verfügung stehen. Wie die Verhältnisse liegen, wenn die Bakterien an nährstoffreiche Partikel, z.B. an sich zersetzende pflanzliche oder tierische Bestandteile angelagert sind, haben wir nicht überprüft. Möglicherweise kommen unter diesen Bedingungen auch Teilungen im Bereich 10° C bis 14° C und darunter zustande.

In gleicher Weise wie Bouillonzusatz fördern anorganischer Stickstoff und Glukose die Vermehrung. Ähnlich wie bei Bouillon kommt es auch hier in Temperaturbereichen, die in reinem Brunnenwasser keine Teilungen zulassen, bei Zusatz relativ geringer Substanzmengen zu Teilungen. Allerdings scheinen höhere Glukosewerte (0,5 %) teilungshemmend zu sein. Hohe NH_4Cl - Werte ermöglichen jedoch schon bei Anwesenheit geringer Glukosemengen (0,0005 - 0,5%) eine Teilung.

Unter natürlichen Bedingungen ist in zahlreichen Fällen mit der Anwesenheit stickstoffhaltiger Verbindungen zu rechnen. Organisch gebundener Stickstoff liegt in bestimmten Huminsäuren vor. Wie die Untersuchungen von SCHÖNWALDER (1958) zeigen, können zahlreiche Mikroorganismen Huminsäuren als Nährstoffquelle verwerten. In Einklang damit stehen die Beobachtungen von KRAUS und WEBER (1957/1958), wonach Humin-

säure - haltiges Wasser das Überleben von Salmonellen eindeutig begünstigt.
Auch Stickstoff in anorganischer Form wird nicht selten in Grund- und Oberflächenwasser angetroffen. Nach KAESS (1956) findet man oft erhebliche Ammoniakmengen im Grundwasser, das aus humusreichen Böden (Moor, Torf) stammt. Sie verdanken ihre Entstehung der Reduktion von Nitraten.

Die bei unseren Versuchen im Laufe von Tagen in der Zählkammer stets von neuem ausgezählten Keime sind natürlich am Ende der Beobachtungszeit in einem gewissen Umfang bereits abgestorben. Unsere Zählungen umfassen lebende und tote Zellen- Durch vergleichende Keimzahlbestimmungen konnte durch Stichproben festgestellt werden, daß bei Zellen, die in Brunnenwasser bei 10°C suspendiert waren, nach 5 Tagen 40% der eingesäten Zellen zugrunde gegangen waren.
Wie unsere Beobachtungen zeigten, bleiben aber die abgestorbenen Zellen vollständig und bei Phasenkontrastbetrachtung von lebenden nicht unterscheidbar erhalten. Selbst bei einer Beobachtungszeit von 17 Tagen bei teilungsnemmenden Temperaturen ließen sich innerhalb der Population keine Zeichen feststellen, die auf eine beginnende oder komplette Autolyse einzelner Zellen hingedeutet hätten. Es ist nicht auszuschließen, daß sich eine Persistenz über unsere Beobachtungs-

zeit hinaus auf wesentlich längere Zeiträume erstreckt. Dieser Befund steht im Gegensatz zur Ansicht verschiedener Untersucher, die die Anwendung der direkten Keimzählung, z.B. mit der Membranfiltermethode, unter anderem mit dem Hinweis auf eine "rasche" Autolyse abgestorbener Bakterien rechtfertigen. Ohne gleichzeitige Einwirkung antibiotischer Substanzen oder ohne fermentativen Angriff seitens anderer Mikroorganismen scheint unserer Erfahrung nach eine lange Persistenz bei Temperaturen, wie sie Oberflächengewässer in der kühlen Jahreszeit oder ganzjährig die Hypolymnien größerer Seen aufweisen, möglich zu sein.

Durch die Miterfassung einer unbekannten Menge toter Zellen ist diese Zählmethode mit einem sehr großen Fehler behaftet, abgesehen von den sonstigen Unsicherheitsfaktoren, wie sie z.B. von GUNKEL (1962) diskutiert werden.

Unsere Arbeitstechnik mußte, um durch Auszählung mehrerer Gesichtsfelder zu statistisch verwertbaren Zellzahlen zu gelangen, mit einer relativ dichten Aufschwemmung durchgeführt werden. 10^7 bis 10^8 Keime/ml entsprechen einer schwach bis mäßig getrübten Aufschwemmung. Die Anwendung solch großer Keimmengen dürften bei der mangelhaften Sauerstoffversorgung (die einzelnen Zählnetze waren durch Vasline allseitig umschlossen) eher eine Vermehrung behindert als begünstigt

haben, wobei sich zusätzlich das im Laufe der Zeit sich anhäufende Kohlendioxyd als bremsender Faktor für die Vermehrung der Keime ausgewirkt haben dürfte (BIGGER 1937). Die innerhalb von 14 Tagen fehlende Autolyse der exponierten Zellen muß jedoch nicht bedeuten, daß von abgestorbenen Individuen keine organischen Stoffe abgegeben werden. Bei der hohen Zellzahl ist auf jeden Fall mit der Anwesenheit organischer Substanzen in der Suspensionsflüßigkeit zu rechnen. Solche Substanzen können wachstunsfördernd sein, indem sie von stoffwechselmäßig aktiven Zellen aufgenommen werden. Da aber bekannt ist, daß die Ausnutzung geringer Nährstoffmengen die Anwesenheit höherer Sauerstoffkonzentrationen voraussetzt, ist nicht damit zu rechnen, daß diese Prozesse einen nennenswerten Einfluß auf den Ablauf unserer Untersuchungen ausgeübt haben.

Wo also mit Hilfe der geschilderten Methodik Keimvermehrungen zu verzeichnen sind, sind sie unter ähnlichen Bedingungen auch in natürlicher Umgebung wahrscheinlich. Da in der Natur teilweise günstigere Bedingungen herrschen, z.B. durch optimale Sauerstoffversorgung bzw. durch erhöhtes Nährstoffangebot aus Partikeln, ist darüberhinaus anzunehmen, daß Teilungen in den besprochenen Temperaturbereichen eher häufiger auftreten werden als in unseren Versuchen. Die geschilderten Experimente zeigen demnach nur das Minimum der unter den jeweiligen Temperaturbedingungen möglichen Teilungsprozesse an.

F) Zusammenfassung

Es wurden Untersuchungen über das Teilungsverhalten von Colikeimen in Brunnenwasser bei geringem Nährstoffangebot und niedriger Temperatur angestellt.
Ergebnisse, die mit dem Membranfilterverfahren bei Anfärbung der Keime mit Methylenblau und Amidoschwarz B erzielt wurden, waren ebenso unbefriedigend wie die bei Direktbeobachtung in Phasenkontrastmikroskop nach Zentrifugierung der Keimaufschwemmung. Alle diese Methoden waren mit erheblichen Fehlern belastet.
Als brauchbar erwies sich schließlich die Auszählung in THOMA - Zählkammern, die, um eine Austrocknung der eingebrachten Keimsuspension zu verhindern, wasserdicht mit steriler weißer Medizinalvaseline und zusätzlich mit Bienenwachs umrandet worden waren. Bei dieser Versuchsanordnung blieben die Keime auch während einer langen Beobachtungszeit stets einwandfrei auszählbar.

Durch Änderung der Inkubationstemperatur und urch Zusätze zum Brunnenwaser kamen wir zu folgenden Ergebnissen:

Bei Aussaat der Keime in sterilem Aqua dest. war nach einer Beobachtungszeit von 11 Tagen bei 8°C eine geringfügige Keimzahlabnahme zu verzeichnen. In sterilfiltriertem Brunnenwasser behielten die Keime über 14 Tage bei 8° C ihre Zahl bei, ebenso erfolgte bei Erhöhung der Temperatur

auf 12° C auch während 17 Tagen keine Vermehrung.
Bei Steigerung der Temperatur auf 14° C konnte in diese Zeit eine Vermehrung um den Faktor 4 nachgewiesen werden.

Andere Verhältnisse liegen bei Suspendierung der Keime in Bouillon vor. In diesem Fall zeigt sich bereits nach 2 1/2 Tagen eine Verdopplung bei 8° C, nach 36 Stunden eine Verfünffachung bei 10° C. Eine Überprüfung dieser Ergebnisse in der Zählkammer ergab, daß nach 5 Tagen noch 60% der Keime vermehrungsfähig waren.

Weitere Versuche hatten zum Ziel, die minimalen Nährstoffkonzentrationen zu ermitteln, die bei 10° C noch Teilung bzw. Wachstum hervorrufen. Reinem Brunnenwasser wurden zunächst Bouillonmengen in steigender Konzentration zugesetzt. Dabei konnte bei 1 ppm organischer Substanz in sieben Tagen eine schwache Teilungsförderung, nach einer weiteren Woche aber keine Zunahme mehr festgestellt werden.
Ein Zusatz von 1% Bouillon ergab einer Steigerung der Keimzahlen auf das Doppelte bzw. Dreifache . 10% Bouillon im Brunnenwasser bewirkte bereits nach 2 Tagen eine Verfünffachung der Keimzahlen.

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, daß auch Glukose und Ammoniumchlorid eine Vermehrung fördern. Es zeigte sich, daß Ammoniumchlorid in höherer Konzentration, kombi-

niert mit Kohlehydratmengen, Teilungen hervorrief, während geringe Ammoniumchloridwerte und hohe Kohlehydratkonzentrationen wirkungslos blieben.

Da Wassertemperaturen von 14° C in einem einwandfreien Grundwasser als große Seltenheit betrachtet werden können, ist nicht mit einer Vermehrung der Colibakterien in einem guten Grundwasser zu rechnen. Überall aber, wo diese Temperaturgrenze erreicht oder überschritten wird, z.B. in stagnierenden Brunnen, in ungünstig verlegten oder stillgelegten Rohrleitungen oder in unzweckmäßigen Versandgefäßen für Wasserproben, können Teilungsprozesse bei *E. coli* (Fäkaltyp) ablaufen. Sind Bakterien an nährstoffreiche Partikel (z.B. in Oberflächengewässern) angelagert, so muß darüberhinaus auch bei Temperaturen zwischen 10° und 14°C und möglicherweise noch darunter mit Teilungsvorgängen gerechnet werden.

G) L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

Allen, C.A., M. Pasley u. M.A.F. Pierce	J.gen. Microbiolog. 7(1952),36
Barber, M.A.	J.Inf.Dis.,5,(19o8),379-4oo
Bigger,J.W.	J.Path.Bact. 44(1937), 167
Bigger,J.W. u.NelsonJ.H.	J.Path.Bact.53,(1941),189-2o6
Braun,H. u. Cahn-Bronner,C.E.	Zbl.Bakt.I!Abt.Orig.86(1921),1
Caldwell,E.L. u. Parr.L.W.	Amer.J.publ.Hlth 23(1933),467
Carpenter,P.L. u.W.H.Peterson	Zbl.Bakt.I.Abt.Ref.127
Cohen,B.	J.Bact. 7 (1922), 183
de Mello,G.C., J.S.Danielson u. J.S. Kiser	J.Lab.Clin.Med. 37(1951),579
	Zit. n.Gunther,S.E.,J.Bact.67(1954) 628
Garvie,E.J.	J.Bact.69(1955), 393
Graham-Smith,G.S.	J.Hyg. 19(192o) 133-2o4
Gunkel,W.	Kieler Meeresforschungen,18(1962).136
Haines,R.B.	J.Hyg.34(1934), 277-282
Halpern,Y.S. u. Umbarger,H.E.	J.Bact.8o(1960),285
Heukelekian,H. u. A.Heller	J.Bact.4o(194o),547
Jannasch,H.W.	Arch.Microbiol.23(1955),146
Jones,G.E.,M.Franklin u. S.B. Thomas	Proceeding of the Society for Applied Bact. 13(195o), 1o8
Kaeß,A.	Vom Wasser,23(1956),2o
Kraus,P. u.G.Weber	Zbl.Bakt.I.Abt.Orig.171(1957/58),5o9
Kurzweil,H.	Zbl.Bakt.I.Abt.Ref.163(1957),339
Murabito,C.	Arch.Hyg. 1o7(1932),29o

Paul,H.Ch.	Der Einfluß der Temperatur bei der Einsendung von Wasserproben auf die Keimzahlen, Diss.Würzburg(1939)
P.H.L.S.Water S.-Committee	J.of Hyg.51(1953),559
P.H.L.S.Water S.-Committee	J.of Hyg.5o(1952).1o7
Schönwalder,H.-J.	Arch. Microbiol.3o(1958).162
Spangler,C.D. u.G.-E.A.Winslow	J.Bact.45(1943),373, Zit.n.Gunther, S.E.,J.Bact.67(1954), 628
Strange,R.E.,F.A.Dark u.A.G.Ness	J.gen.Microbiol.25(1961),61
Webster u. Raghavachari	Indian J.med.Res.23(1935),57
ZoBell,C.E.	J.Bact.46(1943),39
ZoBell,C.E. u.C.W.Grant	J.Bact.45(1943),555

LEBENSLAUF

Ich, Manoutschehr Watanpour, wurde am 26.11.1930 in Babol/Iran geboren. Mein Vater, Hassan Watanpour, war als Krankenhausdirektor in Teheran tätig. Beide Elternteile sind bereits verstorben. In Teheran besuchte ich die Volksschule, anschließend die Oberrealschule bis zum Abitur 1951. Mein Studium an der Tierärztlichen Fakultät der Universität Teheran schloß ich 1955 mit dem Staatsexamen als Veterinär ab. In den folgenden 1 1/2 Jahren absolvierte ich meinen Militärdienst. Bis zu meinem Studienbeginn in Deutschland arbeitete ich als Arzneimittelvertreter bei der Fa. Pfizer in Teheran. Im November 1958 begann ich mein Medizinstudium an der Friedrich - Alexander - Universität in Erlangen und beendete es am 20. Oktober 1965 mit dem Staatsexamen.

Offsetdruck - Fotodruck
Josef Hogl
8520 Erlangen, Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz,) Tel. 22990

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 852 Erlangen, Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990